

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-49718

⑬ Int. Cl. 9
A 61 K 9/127

識別記号 A 7417-4C

⑭ 公開 平成2年(1990)2月20日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全10頁)

⑮ 発明の名称 リポソーム製剤の精製法

⑯ 特願 平1-50917

⑯ 出願 平1(1989)3月1日

優先権主張 ⑯ 昭63(1988)3月4日 ⑯ 日本(JP) ⑯ 特願 昭63-52249

⑯ 昭63(1988)5月7日 ⑯ 日本(JP) ⑯ 特願 昭63-110792

⑰ 発明者 宇田 良明 兵庫県宝塚市仁川町地3番2-501号

⑰ 発明者 伊賀 勝美 大阪府吹田市五月が丘西1番A-808号

⑰ 発明者 星野 哲夫 大阪府豊中市寺内2丁目13番37-504号

⑯ 出願人 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目3番6号

⑯ 代理人 弁理士 岩田 弘

明細書

1. 発明の名称

リポソーム製剤の精製法

2. 特許請求の範囲

(1) 薬物を封入してなるリポソームと未封入薬物とを含有してなる水性液をホローファイバーによる通孔に付し、該ファイバーの外液中に未封入薬物を分離除去することを特徴とするリポソーム製剤の精製法。

(2) ホローファイバー中の水性液を外液圧よりも高くなるように制御する請求項(1)記載の方法。

(3) 差圧が300mHg以下である請求項(2)記載の方法。

3. 発明の特徴な説明

商業上の利由分野

本発明は薬物を封入したリポソーム製剤の精製法に関する。

従来の技術

リン脂質と薬物液とから薬物を封入したリポソームを形成後は、一般に薬物封入リポソームと未封入の遊離薬物とを分離する工程が必要である。

その分離技術としては、従来、セロファン袋膜による透析法(「細胞工学」2, 1136(1983))

、超遠心分離法(Biochemistry 17, 1792(1978))、ゲルろ過法(Biochemistry 8, 34

4(1969))などが知られている。

上記のように、リポソームに未封入の遊離薬物を分離除去する方法は、従来、いくつか見られるものの、いずれの方法も工業的スケールで実施するには不適当である。例えば、セロファン袋膜を用いる方法は、処理対象であるリポソーム懸濁液を袋膜に小分する作業が煩雑なこと、長時間の処理時間を要すること、品質が一定しないこと、無菌化製造することが容易でないことなどの欠点がある。超遠心分離法の場合、超遠心装置にリポソーム懸濁液を小分け分注し、遠心分離した後、上清を撇取して沈降物を回収するという操作を数回くり返して遊離薬物を除去する方法であり、やはり操作が煩雑となり、無菌化処理も因難なこと

が予想される。さらに、リボソームの種類(例えば、SUV、REV)によっては、リボソームが完全に沈降せず、上清の界面時に流出し、完全な回収が困難であることから、比較的粒径の大きいリボソームに限られること、また、遠心沈降によるリボソームの凝集が起こり、再分散後、凝集体を形成することが懸念される。

一方、ゲルろ過法は、薬物を吸着するための級筋剤を充填したカラムにリボソーム懸濁液を流通させ、未封入薬物を吸着分離する方法であるが、カラム通過速度が比較的遅いため、処理時間に長時間を要すること、カラム溶離液により希釈されるので、後に濃縮工程が必要であること、吸着剤にリン脂質が吸着することも起こりうるので、空リボソーム等での前処理が必要であること、とくには試料注入部への物理的なブロッキングが認められること、また、再使用するには吸着剤の再生処理(吸着した薬物の再溶解除去処理)が必要であること、無菌化処理(使用前の吸着剤の滅菌処理)が困難であることなどの欠点がある。

本発明でいう「薬物を封入してなるリボソームと未封入薬物とを含有してなる水性液」は、水に薬物を封入してなるリボソームが懸濁しており、同時にその水に薬物が含有されている系であれば特に限定されない。一般にはリン脂質と薬物液を用いて自体公知の方法によって薬物を封入するリボソームを調製した後に得られる液であって、該リボソームを懸濁し、かつ未封入の薬物を含有している水性液が主対象となる。以下、本明細書では上記の水性液を単に「リボソーム懸濁液」と称することもある。薬物を封入するリボソーム製剤の調製において、現在まで知られているリボソームの形成法では、未封入薬物の発生は避け難い。そして、リボソーム製剤を DDS (Drug Delivery System) 等の目的で使用する場合、未封入薬物は予め除去しておくことが一時的に望ましいことが多い。本発明の適用対象となりうるリボソームの種類は、SUV (small unilamellar vesicle)、MLV (multilamellar vesicle)、LUV (large unilamellar vesicle)、REV (reverse-phase

発明が解決しようとする課題

上記のように薬物封入リボソーム製剤の製造法において、未封入の遊離薬物を効率的に分離除去する方法はまだ完成されていない。この工業的実施のためには、大量処理が短時間で実施できること、無菌化処理が簡単にできること、リボソーム製剤の製造と連結することができ一貫した操作で、一日内に製品化できること、などの条件をできるだけ満足する必要がある。

課題を解決するための手段

以上の点に鑑み、本発明者は総合研究を重ねた結果、リボソーム製剤の製造における未封入薬物の分離除去には、クローファイバー型透析器が工業的有利に利用できることを知り、本発明を完成した。

すなわち、本発明は薬物を封入してなるリボソームと未封入薬物とを含有してなる水性液をクローファイバーによる透析に付し、該ファイバーの外液中に未封入薬物を分離除去することを特徴とするリボソーム製剤の新製法である。

evaporation vesicle)あるいはSPLV (stable plurilamellar vesicle)のいずれであってもよい。

次に、本発明に用いるクローファイバー型透析器は、半透膜の材質からなり中空を有する纖維を一般に数千本を束ねて形成し、かつ該纖維の外側に透析液を流通するよう構成された装置をいう。この例としては、公知のクローファイバー型人工腎臓と同様に構成された透析装置があげられる。クローファイバーの材質は、リボソーム形成材料であるリン脂質と反応もしくは寄生を起こさないことを基準に天然高分子膜またはその加工処理膜、再生高分子膜あるいは合成高分子膜のなかから選択すればよい。

具体的には、天然高分子膜またはその加工処理膜としてはセロファン、架橋コラーゲンが、再生高分子膜としては各種のセルロース系膜、たとえば、酢酸セルロース(例、酢化 50% 以上)、三酢酸セルロース、酢酸・醋酸セルロース、ニトロセルロース、キュプロ・アンモニウム・レーリン膜等

あげられる。

また合成高分子膜としては、ポリビニールアルコール、ポリビニルビロリドン・メチレンビス・イ・フェニルイソシアネート(MDI)、ポリエチレングリコールMDI、ポリビスフェノール・カーボキシート・ポリエチレン、ポリブニルアセテート、ポリスルファンカーボネイト、ポリエチレン、ポリアクリロニトリル、ポリメチルメタクリレート膜等が検討されており、これらの中でもポリビニルアルコールMDI、聚丙烯酸、ポリビスフェノール・カーボネイト、ポリエチレンオキシド、ポリビニルアセテート、ポリスルファンカーボネイト、ポリアクリルニトリル、ポリメチルメタクリレート膜等が本発明では好ましく用いられる。

ホーファイバー膜の透過性は尿素透析速度で表わしたときの半減期が、セロファンと同等をもしくは小であることが一般に好ましく、たとえばセロファンの半減期を1とした場合、約0.2~1

の透過性を有するものが有利に使用できる。

本発明において、ホーファイバーの透過性を高選する基準は、使用する薬物の分子の大きさ等とも関係するのでこの点について説明する。

まず、本リボソーム製剤の製造に用いられる薬物の種類は、水溶性薬物であってマイクロカプセル化して使用する可能性を有するものが対象となり得る。水溶性の程度は、たとえば、オクタノール/水で示される分配率の対数値が1.0以下であるものをいう。ホーファイバーは、薬物を透過しリボソームを透過しないような孔径を有するものを選択するが、薬物の透過性はファイバーの孔径と薬物の分子の大きさに関係する。例えば、孔径6Åではクレアチニン(分子量113), 15ÅでビタミンB₁₂(分子量1,350), 24Åでイヌリン(分子量5,200), 32ÅでチトフロームC(分子量24,000), 46Åでβ-イミノグロブリン(分子量38,000), 55Åでアルブミン(分子量60,000)等に相当し、透析性の目安になる。ホーファイバー型透析器の中空纖維膜とし

て一般によく使用されるキュプロ・アンモニウム・レーヨンの場合、孔径が約20Åである。分子量3,000以下の薬物であれば約20Åの孔径を有するホーファイバー膜で有効に透析される。

本発明においては、分子量が約100~約5万の薬物が好ましい適用対象である。以下に、本発明方法において適用可能な薬物の例を分子量の範囲別に示す。

(1) 分子量100以上1000以下

(例) シスプラチナ(CDDP)、カルボプラチニン、イプロプラチニン、ドトラブリチニン等の金属錯体、マイドマイシン、アドリアマイシン、アンサマイシン、アクチノマイシンあるいはその誘導体(例、9-ナオメイクサンシン)、ブレオマイシン、Ara-C、ダウノマイシン等の制癌生物質、5-FU、メトトレキセート、TAC-788(イソブチル5-フルオロ-6-(E)-フルフリデンアミノオキシ-1,2,3,4,5,6-ヘキサヒドロ-2,4-ジオキソビリミジン-5-カルボキシレート、特開昭59-13780号)等の代謝拮抗剤、B

CNU、CCNU等のアルキル化剤、メルファラン、ミトキサントロン等の抗腫瘍剤、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、カナマイシン、ジベカシン、パロモマイシン、カニンドマイシン、リビドマイシン、トブラマイシン、アミカシン、ラジオマイシン、レソマイシン等のアミノ配糖系抗生物質、スルベニシリン、メシリタム、カルベニシリン、ビペラシリン、チカルシリン等のペニシリン類、チエナマイシン類、セフォチアム、セフスロジン、セフメノキシム、セフメタゾール、セファブリン、セフィタキシム、セフィベラゾン、セフチゾキシム、モキソラクタム等のセファロスボリン類等のβ-ラクタム系抗生物質、TRH類(例、TRH、TRHアナログ(例、レ- N -(2-オキソビペラジン-6-カルボニル)-L-ヒスチジル-L-チアゾリジン-4-カルボキサミド、L-2-オキソオキサブリシン-4-カルボニル-L-ヒスチジル-L-ヒスチジル-L-プロリンアミド、L-トラノス-5-メチル-2-オキソオキサブリジン-4-カルボニル-L-ヒスチジル-L-プロリンアミド、L-2-オキ

ソチアゾリジン-4-カルボニル-レ-ヒスチジル-レ-ブロリンアミド, テープチロラクトン-カカルボニル-レ-ヒスチジル-レ-ブロリンアミド, 2-ケトビペリジン-6-カルボニル-レ-ヒスチジル-レ-ブロリンアミド, 3-オキソバーハイドロー-1,4-チアジン-5-カルボニル-レ-ヒスチジル-レ-ブロリンアミド)これらTRH, TRHアナログのアミド基における水素原子がメチル基, エチル基, n-プロピル基, n-ブチル基, n-ヘキシル基, n-アミル基, β-フェニル基で置換された化合物, ならびにこれら化合物の酢酸塩, 酒石酸塩など), エンケファリン等のペプチド系薬物, アスピリン, ジフルニサール, インドメタシン, ジクロフェナック, フェンブフェン, スハンダク, アセメタシン, イブプロフェン, ナブセン, ケトプロフェン, フラバイプロフェン, フェノプロフェン, チアプロフェン, ブラノプロフェン, メフェナム酸, ツルフェナム酸, フルフェナム酸, フェニルブタゾン, オキシフェン, ブタゾン, ピロキシカム, メビゾーム, エモルファゾン等抗炎

症剤, 鎮痛剤, 解熱剤そして各種プロスタグランジン及びその誘導体。

(2) 分子量1 000以上2 000以下

(例) グラミシジンD, バシトラシン等のペプチド系抗生物質

(3) 分子量2 000以上5 000以下

(例) ACTH, ポリミキシンB, コリスチン等ペプチド系物質

(4) 分子量5 000以上10 000以下

(例) ヘパリン, レンチナン, ザイモサン, PS-K等の多糖類, インスリン, 成長ホルモン等のペプチドホルモン

(5) 分子量10 000以上20 000以下

(例) インターフェロン(α, β, γ), インタロイキン2, TNF等のリンギカイン類

(6) 分子量20 000以上60 000以下

(例) SOD

次に、ホローファイバーは、通常、その中空内径が約150~250 μm, 膜厚さは約10~20 μmの形状を有するものが好ましく用いられる。

ホローファイバー型の透析器として用いる場合、表面積の大きな一本のファイバーを使用してもよいが、大量処理の目的をより容易に達成するためには、小管面積のホローファイバーを複数個並列または直列に連結して用いるのが有利である。さらに、ホローファイバーを多数束にして用いるのが好ましく、例えば、内径2.00 μmで有効長2.3~5 cmのホローファイバーを99.00本束束させることによって、透析面積1.5 m²の透析器が得られ、この程度の表面積を有するものが実用的に利用しうる。束束させたホローファイバーをさらに直列または並列に連結させることにより、透析面積の拡大をはかってもよい。

次に、本発明の透析処理法においては、ホローファイバーの外側に液を流通させて、透通してきた薬物を系外に除去させるが、この透析外液として単に水を用いてもよいが、そのリガーソム製剤の投与形態に合うような液を用いるのが実用上、好適である。すなわち、温血動物が生理的に許在し得るような各種物質の水溶液、具体的には、

塩類(例、食塩), 酸類(例、ぶどう糖, マンニット, ソルビット), アミノ酸類(例、グリシン, アスパラギン酸, グルタミン酸)などの水溶液あるいはこれらの2種またはそれ以上の混合溶液があげられる。これらの中でも、生理食塩水は各種薬剤の静脈投与の際に最も広く用いられている分散媒であり、本発明においても有利に用いることができる。

本発明方法は、たとえば第1図(a)に示す装置を用いて、次のような順序で実施できる。

第1図(a)に示す装置において、貯留容器①にリガーソム懸濁液を仕込み、透波ポンプ②によって、送波パイプ③を介して連結されているホローファイバー型透析器④に液送される。透析器④は第1図(b)に示される構造を有し、ホローファイバー⑤は接着固定部⑥によって集束された状態でケース⑦内に収められており、該ケース⑦は透析外液入口⑧および流出出口⑨を有し、ホローファイバーの外側に透析外液を通過させうる。リガーソム懸濁液は、透析器④の流入口⑩に液送され、ホローファイバー内に送り込まれ、流出

口③から、送液パイプ④を通して貯留容器①に戻る。一方、第1図(a)の貯留容器④に仕込まれた透析外液は送液ポンプ⑦によって送液パイプ④を通して、前記のキローファイバー型透析器の透析外液流入口⑧、流出口⑨、送液パイプ⑩を通って、透析器外に放出させる。この透析外液は、必要に応じて活性炭、イオン交換樹脂により薬物を吸着・除去したのち、廃液使用し得る。かくして、リポソーム懸濁液中の遊離薬物はキローファイバーの膜を通過して、透析外液中に溶解して、次第に系外に分離されていき、精製されたリポソーム剤を貯留容器①に回収することができる。

本発明において、キローファイバー内部の圧力を透析外液のそれよりも高くなるように制御しながら透析を続けると、遊離薬物の除去効率を高めることができる。この差圧は一般に30.0mmHgまでに制御されるが、好ましくは約5.0mmHg以下から好ましくは1.0～5.0mmHgとなるよう精製される。差圧を5.0mmHg以上になると、水の透過も大きくなり、リポソーム分散液が濃縮

一方、より実用的には第2図に示されるように、リポソーム製造装置と、たとえば第1図(b)に示されるキローファイバー透析装置とを直結させることによりクローズドシステムで、リポソーム懸濁液の製造と未封入薬物の分離除去を一貫処理でき、作業性を一段と向上させ得る。この場合、キローファイバー透析装置は、予め高圧蒸気滅菌などの処理を施しておくことにより、精製されたリポソーム製剤を無菌的に製造することができる。

実施例

以下に実験例及び実施例を示し、本発明を更に詳しく述べるが、これらははら本発明を限定するものではない。

実験例 1

(1) REVリポソームの製法

1. 丸底フラスコ中に、0.5mM 6-CP(6-カルボキシフルオレセイン)の生理食塩水溶液30.0mlとサン脂質(ジパルミトイリフオスファチジルコリン:ジステアリルフォスファチジルコリン=9:1)6gをクロロホルム:ジソプロ

されてくるので、未封入の遊離薬物の分散除去と同時に濃縮を行なうことも可能である。ただ、過剰の差圧下で濃縮を行なわせると、リポソーム内に封入されている薬物が漏出してくることがあり好ましくない場合がある。この差圧の制御方法は、たとえば第1図(a)に示される装置において、リポソーム懸濁液透液パイプ⑩および透析外液透液パイプ④にそれぞれ設置された差圧調整バルブ等によって調整される。特に、高分子量薬物(例、分子量1～6万)の場合には、拡散透析速度が遅いため、より効率を上げるためにキローファイバー膜内部を加圧して行なう中空纖維透析が有効であり、この場合、耐圧強度をもたせるために膜はやや厚い方がよい。

リポソーム懸濁液と透析外液は、第1図(a)のように、向流方式で流通させるのが一般的であるが、並流方式の場合によっては採用できる。キローファイバー透析器は④に示すような装置を、さらに直列または並列で複数個連結させることにより、さらに大量処理に適した装置を用いてもよい。

ピルエーテル(1:1)の混合溶媒30.0mlに溶解した液を入れて混合し、次に浴槽型超音波発生機(60W)で20分間超音波照射して乳化した。これを、5.5℃の水浴加温下で真空ロータリーエバボレーターによって精製溶媒を徐々に留去して、6-CPを封入するREVリポソームの懸濁液を調製した。本懸濁液にはリポソームに未封入の6-CPが溶解されている。

(2) 透析法

対照透析法: セロファン袋膜(内径2cm、長さ1m、0.08mm²、スペクトラボア、SPECTRUM MEDICAL INDUSTRIES, INC.製)にリポソーム懸濁液30.0mlを充填し、これを生理食塩水溶液1.0g中に浸漬し、室温下で攪拌しながら透析した。

本発明透析法: キュプラ・アンモニクム・レーヨン使用のキローファイバー型透析器(中空の平均内径2.00μm、有効表面積0.8m²、TAF 0.8W型、テルモ製)を用いて、リポソーム懸濁液循環流150ml/分、透析外液(生理食塩水)の流量500ml/分で懸濁液と透析外液との差圧

が1.0 mg/ml の条件でリボソーム懸濁液3.0 mlを処理した。

(3) 透析分離除去の効果の測定

未封入の遊離6-CFの分離除去の効果は、分離除去前のリボソーム懸濁液中の遊離6-CFの含量に対する分離除去後の同含量の百分率(残存率)で表わした。

(4) 遊離6-CFの測定法

リボソーム懸濁液の0.1 mlを採取し、セントリザルト(Centrifuge 1, SM 133249, 西ドイツ)に入れ、生理食塩水1 mlを加えて遠心分離(2000 rpm, 5分間)して、遊離6-CFのみを含有する上清の一定量を蒸留水で100倍に希釈したのち、光路長1 cmの石英セルに入れ、蛍光分光器によって蛍光強度(励起波長494 nm、蛍光波長515 nm)を測定し、検量線から遊離6-CFを定量した。検量線は、別に6-CFの標準液の蛍光強度を測定し、検量線から遊離6-CFを定量した。

(5) 結 果

対照透析法と本発明透析法をそれぞれ適用した

時間数を短縮することができた。

実験例2

実験例1と同様の方法で調製した6-CF封入リボソーム懸濁液を用いて、超遠心分離(12000 $\times g$, 30分間)法と本発明法による未封入6-CF液の分離効果について比較した。

その結果、超遠心分離法では、粒径の小さいリボソームが完全に沈降せずに上清中に浮遊し、傾斜分離操作中にリボソームが流出し、損失量が大きかった。また、分離除去率は1回だけの超遠心分離処理では、6-CF残存率が6.3%と大きく、洗浄と遠心分離の操作を3回繰り返した後にはじめて1%以下となり、従って約90分もの処理時間が必要、大量処理が困難であった。これに対し、本発明法は全ての種類のリボソームに適用でき、リボソームをほとんど損失することなく、きわめて短時間に大量処理できた。

実験例3

(1) シスプラチナ(CDDP)封入のREVの調製

ときの、処理時間と6-CF残存率との関係を表す。

表1

時間(hr)	6-CF残存率(%)								
	0	0.88	0.25	0.5	0.66	6	24	48	72
対照 透析法	100	-	-	-	-	78	27	6	<0.8
本発明 透析法	100	25	3	<1.0	<0.1	-	-	-	-

表1の結果から明らかなように、セロファン袋膜透析法とリボソーム中へ未封入の遊離6-CFの残存率が72時間(3日)後に漸く0.8%以下になるのに対し、本発明法によると遊離6-CFの残存率は40分間で0.1%以下にすることができ、きわめて短時間で効率的に分離除去できる。

さらに、前記の本発明の透析法において、有効面積を1.5 m^2 に増大したキローフィバーを使用した場合は、処理時間20分でも6-CF残存率を0.1%以下にすることができ、さらに短

時間数を短縮することができた。

実験例1のREV調製法において、6-CFの代わりにCDDP(300 μg)を用いて同様の方法によりCDDPを封入するリボソームを懸濁し、未封入のCDDPを溶解する液を得た。

(2) 透析法

対照透析法: 実験例1と同様に、セロファン袋膜にCDDP封入リボソーム懸濁液3.0 mlを充填し、同様の処理をした。

本発明透析法: 実験例1と同様の条件で、CDDP封入リボソーム懸濁液の3.0 mlを処理した。

(3) 透析分離除去の効果の測定

前記リボソーム懸濁液中の未封入の遊離CDDP含量を、実験例1の第(3)項に示したと同様の操作で、分離除去前及び分離除去後において定量し、残存率を測定した。

(4) 遊離CDDPの測定法

遊離CDDPの測定は実験例1の第(4)項に示したと同様の操作で、CDDP封入リボソームと遊離CDDPをセントリザルト(Centrifuge 1,

SM 13249(西独製)で分離し、遊離 CDDP のみ含有する上清の 0.1 倍を採取し、内部標準液 0.1 倍を加えて、その一定量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法によって定量した。HPLC の条件を以下に示す。

カラム: 日立ゲル 2013B 4 mmφ × 15 cm

カラム温度: 50°C

分離度: 0.02 M KH₂PO₄-HCl(pH 3.0)

流速: 0.9 ml/min, 検出: UV 210 nm

内部標準液: ヒゴキサンチン(4 μg/ml)水溶液表 2 にその結果を示す。

表 2

CDDP 残存率(%)							
時間(hr)	0	0.08	0.25	0.33	0.5	6	24
対照	100	-	-	-	78	27	6 < 0.8
透析法	100	21	4.8	1.2	< 0.2	-	-
本発明	100	21	4.8	1.2	< 0.2	-	-

この結果、セロファン袋膜透析法の場合、未封

の遊離 CDDP を分離除去できた。その結果、遊離の CDDP を含有せず、CDDP の封入率 20 % のリボソーム製剤を得た。

実施例 2

実施例 1 と同様の方法で製造した、CDDP 封入 R E V リボソーム懸濁液 500 ml を、ホローファイバー型透析器(有効表面積 1.5 m²、キュプラ・アンモニウム・レーヨン、テルモ製 T A F - 15 W 型)を用い、リボソーム懸濁液の循環流出口系路の差圧調節バルブを絞って圧力を高めて、透析外液側との差圧を 70 mmHg にした。この条件下で 0.3 時間処理し、未封入の遊離 CDDP の残存率が 0.5 % 以下で、リボソームを分散する液量が初期量の 80 % に濃縮されており、CDDP の封入率 20 % のリボソーム製剤を得た。

実施例 3

前記実施例 1 と同様の方法で製造した、CDDP 封入リボソーム懸濁液 1000 ml を調製した。この懸濁液をホローファイバー型透析器(有効表面積 1.5 m²、キュプラ・アンモニウム・レーヨ

入の遊離 CDDP の分離除去残存率が、7.2 時間後(3 日)後によく 0.8 % になるのに対し、本発明によると 30 分後で 0.2 % にすることができる、きわめて短時間に分離除去できる。

実施例 4

シスプラチナ(CDDP)の 1 mg/ml 生理食塩水溶液 500 ml とリン脂質(ジパルミトイルフィスファチジルコリン: ジステアリルフィスファチジルコリン = 9:1) 1.0 g をクロロホルム: ジソプロピルエーテル(1:1) の混合浴媒に溶解した浴液 500 ml とから、CDDP 封入 R E V リボソームを実験例 1 の方法に準じて製造した。このリボソーム懸濁液をホローファイバー型透析器(有効表面積 1.5 m²、キュプラ・アンモニウム・レーヨン、テルモ製 T A F - 15 W 型)を用い、リボソーム懸濁液のホローファイバー内部循環流量 1.50 ml/min、透析外液(生理食塩水)流量 500 ml/min リボソーム懸濁液の循環液流出側系路と透析外液側との差圧を 1.0 mmHg に調整した。この気条件下で 0.5 時間処理することにより、未封入

シスプラチナ(CDDP)を 2 本並列に連結した透析器を用いて、リボソーム懸濁液側と透析外液側の差圧を 1.0 mmHg に調整した条件下で、未封入 CDDP の分離除去を行い、処理時間 0.5 時間で遊離 CDDP を実質的に含まず、CDDP 封入率 20 % のリボソーム製剤を得た。

実施例 4

CDDP 0.6 g を溶解した生理食塩水浴液 600 ml とリン脂質(ジパルミトイルフィスファチジルコリン: ジステアリルフィスファチジルコリン = 9:1) 1.2 g を溶解した有機溶媒浴液(クロロホルム: ジソプロピルエーテル(1:1)) 600 ml をを真空乳化機(アジホモミキサー(回転数 15000 rpm, 30 分間))で乳化し、60 °C の加温及び減圧下でパドルミキサーによって攪拌(80 回転/分)しながら、徐々に有機浴液を留出させて CDDP を封入する R E V リボソームを製造した。このリボソーム懸濁液 1.50 ml をホローファイバー型透析器(有効表面積 1.5 m²、キュプラ・ア

ンモニウム・レーモン、テルモ製TAF-15W型)を用い、リポソーム懸濁液漏出量150ml/分、透析外液に生理食塩水を用い流量500ml/分で前者と後者の差圧を10mmHgに調整した条件によって分離除去し、1.2時間でCDDP封入率20%のリポソーム製剤(1150ml)を得た。

実施例5

実施例4と同様のホローファイバー型透析器(透析面積1.5*²、キュプラ・アンモニウム・レーモン、テルモ製TAF-15W型)を予め高圧蒸気滅菌した。この透析器にリポソーム製造装置である真空乳化機(アジホモ・キサーM型、特殊機化工業製)を直結し、実施例4と同様の方法でリポソーム製造後直ちにクローズドシステム(第2図)で、リポソーム懸濁液をホローファイバー内に循環させて透析外液に生理食塩水を用い、流量500ml/分で、リポソーム分散液と透析外液との差圧を10mmHgに調整した。この条件で未封入の遊離CDDPを分離除去し、無菌化リポソームを一貫処理で製造した。このとき、透析時間は1時間で、CDDP封入率20%のリポソーム分散液(1000ml)を得た。

実施例6

卵黄レシチン1gを含有するクロロホルム溶液100mlを500ml滅菌ナス型コルベットに入れ、真空ローラークリーベボレーターでクロロホルムを徐々に留去して、ガラス壁にリン脂質の薄膜を形成させ、これに生理食塩水に溶解した1ng/mlのCDDP 60mlを加え、よく搅拌しながらCDDPを封入し、CDDP液に分散されたMLVを製造した。この方法でMLVを5バッチ製造し、これらを合わせて300mlをホローファイバー型透析器(キュプラ・アンモニウム・レーモン、有効面積0.8*²、TAF 0.8型、テルモ製)を用い、リポソーム漏出量150ml/分、透析外液流量(生理食塩水)500ml/分で処理し、未封入の遊離CDDPを分離除去して、0.3時間で封入率3%のリポソーム分散液(300ml)を得た。

実施例7

実施例1で用いられる1ng/ml CDDPの代わりに200μg/mlの5-フルオロウラシル(5-FU)を用いて、それ以外は実施例1と同じ方法で、5-FUを封入するリポソーム懸濁液を得て、同じ透析条件で未封入の遊離5-FUを分離除去して、0.5時間処理で封入率22%のリポソーム分散液(300ml)を得た。

実施例8

実施例1で用いられる1ng/ml CDDPの代わりに、200μg/mlのマイトイシンC(MMC)を用いて、それ以外は実施例1と同じ方法で、MMCを封入するリポソーム製剤を得て、同じ透析条件で未封入の遊離MMCを分離除去して、0.5時間処理で封入率24%のリポソーム分散液(300ml)を得た。

実施例9

実施例1で用いられる1ng/ml CDDPの代わりに、500μg/mlのアクラルビシン(kra-C)を用いて、それ以外は実施例1と同じ方法で、kra-Cを封入するリポソーム製剤を得て、同じ透析条件で未封入の遊離kra-Cを分離除去して、0.5時間処理で封入率20%のリポソーム分散液(300ml)を得た。

実施例10

実施例1で用いられる1ng/ml CDDPの代わりに、200μg/mlのビスクロルエチルニトロソウレア(BCNU)を用いて、それ以外は実施例1と同じ方法で、BCNUを封入するリポソーム製剤を得て、同じ透析条件で未封入の遊離BCNUを分離除去して、0.5時間処理で封入率20%のリポソーム分散液(300ml)を得た。

実施例11

1.8gのDPPCと2gのDSPCを2Lのビーカー内でクロロホルムとイソプロピルエーテルの1:1の混合溶液1000mlに溶解した。この溶液に浸透圧が生理食塩水の浸透圧の1.9倍となるようにあらかじめ調整しておいた500μg/mlのCDDP食塩水溶液を1000ml加え軽く混合した後、乳化機(3kg用ホモミキサー、特殊機化工業製)で60分間乳化しW/Oエマルジョンを得た。

作製した。このようにして得たエマルジョンを同じホモミキサーを用いて、60°C減圧下で有機溶媒を留去することによりUVを得た。さらに得られたLUVの一部500mgをキローファイバー型透析器[AM-Neo-2000型、培化成膜、ファイバー長約25cm、有効膜面積1.5cm²]中に、約150ml/分の速度で注入し、透析外液として生理食塩水をキローファイバーにかかる膜圧が0となるように、約50ml/minの速度で流すことにより、透析CDDPを透析除去し、CDDPが上記稀釈液と共に封入されたリボソーム製剤を得た。

発明の効果

本発明によると、薬物を封入してなるリボソームと未封入薬物とを含有してなる水性液から、未封入薬物を実用的に有利に分離除去でき、リボソーム製剤の精製法として確めて有用である。すなわち、従来、採用されてきた透析袋膜法、透心分離法、ゲルろ過法に比較して、短時間に大量処理が可能であること、透析装置の殺菌処理が可能である。

第2図は、リボソーム製造装置にキローファイバー型透析器を直結させ、薬物を封入するリボソームの調製と未封入の薬物の分離を無菌的に一貫して実施できる装置の一例を示す。図中、①リボソーム製造装置(真空乳化機)、②リボソーム懸濁液、③キローファイバー型透析器、④リボソーム懸濁液濃度測定ポンプ、⑤透析外液送液ポンプ、⑥リボソーム懸濁液送液パイプ、⑦透析外液送液パイプ、⑧中空纖維内漏圧調整バルブ、⑨透析外液調圧調整バルブ、⑩透析外液貯留タンクをそれぞれ示す。

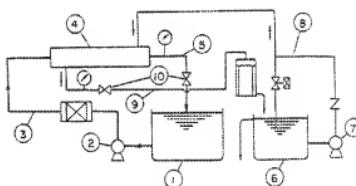
ありかつリボソーム製造装置と直結したクローズドシステムを採用すること、などにおいて極めて実用に適した方法である。また、本発明方法を適用しても、リボソームに損傷を与えることがなく、封入された薬物の漏出を起こさないので、この点でも優れた方法である。

4. 四面の簡単な説明

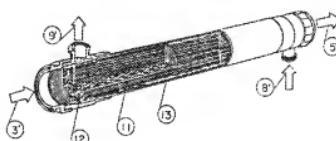
第1図(a)は、本発明に用いる装置の構造を示す。図中、①はリボソーム懸濁液貯留容器、②はリボソーム懸濁液送液ポンプ、③および④はリボソーム懸濁液の送液パイプ、⑤はキローファイバー型透析器、⑥は透析外液貯留容器、⑦は透析外液送液ポンプ、⑧および⑨は透析外液送液パイプ、⑩は差圧調整バルブをそれぞれ示す。

第1図(b)は、第1図(a)中の④キローファイバー型透析器の拡大図を示す。⑩中空纖維処理(ホロー・ファイバー)、⑪中空纖維集束接着固定部、⑫ケース、⑬リボソーム懸濁液流入口(透析前)、⑭リボソーム懸濁液流出口(透析後)、⑮透析外液流入口、⑯透析外液流出口をそれぞれ示す。

第1図(a)



第1図(b)



代理人 斎藤 岩田 弘

第 2 図

